DALVA ADELINA DA SILVA

Desenvolvimento de uma estratégia vacinal dose-reforço heterólogo baseada em linhagens recombinantes de *Bacillus subtilis* para controle do *Streptococcus mutans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2017

RESUMO

SILVA, D. A. **Desenvolvimento de uma estratégia vacinal dose-reforço heterólogo baseada em linhagens recombinantes de *Bacillus subtilis* para controle do *Streptococcus mutans***. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A cárie dental é uma doença bacteriana infecciosa considerada como um dos principais problemas de saúde pública. O principal agente etiológico para o desenvolvimento da doença é o *Streptococcus mutans*. A proteína P1, também conhecida como antígeno I/II, do *S. mutans* é fundamental para a etapa inicial de adesão à superfície dental (sacarose-independente), sendo, portanto, considerada essencial para o processo de colonização deste patógeno. Algumas regiões dessa proteína vêm sendo empregadas como antígenos em estratégias vacinais contra a cárie, entre elas a região A, localizada na porção N-terminal, conhecida como região de ligação à saliva *Saliva Binding Region* (SBR). No entanto, apesar dos avanços, não existe vacina para a prevenção da cárie licenciada para uso em humanos. Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e caracterização de uma nova estratégia vacinal contra o *S. mutans* baseada em esquema de dose-reforço heterólogo, utilizando o fragmento P1₃₉₋₅₁₂, na forma de proteína purificada, expressa a partir de linhagens recombinantes de *Bacillus subtilis*. A proteína P1₃₉₋₅₁₂ compreende os aminoácidos 39-512 da proteína nativa, o que corresponde a toda região A e uma pequena porção da região variável da proteína P1. Utilizamos esporos de *B. subtilis* 1012, modificados para expressar o antígeno P1₃₉₋₅₁₂ (LDV702). A linhagem LDV704, além de expressar o antígeno, foi modificada para expressar uma invasina (InvA) com capacidade de se ligar a epitélios de mucosa. Camundongos da linhagem BALB/c foram imunizados por via sublingual com uma dose de esporos de *B. subtilis* (linhagens 1012, LDV702, LDV704 ou PBS) seguidos por dois reforços com a proteína P1₃₉₋₅₁₂, associada ou não com o adjuvante LTK63. Níveis significativos de anticorpos séricos foram induzidos pelas formulações em associação com o adjuvante após a terceira dose, e mostraram-se capazes de reconhecer os epítomos em diferentes linhagens de *S. mutans*. No entanto, nenhuma das formulações mostrou-se capaz de ativar respostas de mucosa (S-IgA). Porém, observamos que o adjuvante LTK63 empregado na estratégia dose-reforço heterólogo potencializou a resposta sérica de anticorpos IgG, sendo capaz de modular e melhorar qualitativamente as respostas induzidas. Assim, a administração das formulações na presença do adjuvante representa uma alternativa promissora para o controle do *S. mutans*.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*, cárie dental, vacinas de mucosa, *Bacillus subtilis*, imunização sublingual, regime vacinal dose-reforço heterólogo.

ABSTRACT

SILVA, D. A. **Development of a heterologous reinforcement dose vaccine strategy based on recombinant strains of *Bacillus subtilis* for the control of *Streptococcus mutans*.** 84 p. Thesis (Master's Degree in Microbiology) – Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2017.

Dental caries is an infectious bacterial disease considered as one of the main public health problems. The main etiological agent for the development of the disease is the *Streptococcus mutans*. The P1 protein, also known as *S. mutans* Ag I / II antigen, is essential for the initial stages of adhesion to the dental surface (sucrose-independent) and is, therefore, considered essential for the colonization process of this pathogen. Some regions of this protein have been used as antigens in vaccine strategies against caries, among them the A region, located at the amino terminal region also known as the Saliva Binding Region (SBR). However, despite the advances, there is no licensed anti-caries vaccine for human use. Therefore, the present work aims to develop and characterize a new vaccine strategy against *S. mutans* based on a heterologous priming/boost immunization regimen using the recombinant P1₃₉₋₅₁₂ fragment, expressed and purified from a *Bacillus subtilis* strain. The P1₃₉₋₅₁₂ protein comprises amino acids that encompasses the entire A region and a small portion of the variable region of the P1 protein. We used spores of *B. subtilis* 1012 (wild-strain) and recombinants that were modified to express the antigen P1₃₉₋₅₁₂ (LDV702). In addition to express the antigen, the LDV704 strain was modified to express a surface-exposed bacterial invasin (InvA) capable of binding to the mucosal epithelia. BALB/c mice were primed via the sublingual route with a dose of *B. subtilis* spores (1012, LDV702, or LDV704 strains) followed by two boosting doses with the purified protein P1₃₉₋₅₁₂, associated or not with the LTK63 adjuvant, by the same administration route. Significant serum antibody levels were induced by the formulations with the adjuvants after the third dose and the antibodies were shown to recognize epitopes exposed on the surface of different *S. mutans* strains. However, none of the formulations were capable to activate mucosal responses (S-IgA). Nevertheless, we observed that the LTK63 enhanced the serum IgG responses and qualitatively improved the induced antibody response. Thus, the administration of the formulations in the presence of the adjuvant represents a promising alternative for the control of *S. mutans*.

Key words: *Streptococcus mutans*, dental caries, mucosal vaccines, *Bacillus subtilis*, sublingual immunization, prime-boost immunization regimen.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A cárie dental e o *Streptococcus mutans*

A cárie é uma doença oral de caráter crônico e infeccioso, definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um dos principais problemas de saúde pública no mundo (PETERSEN, 2003; WORSLEY et al., 2016). Essa doença atinge países subdesenvolvidos ou mesmo aqueles mais desenvolvidos, sendo as populações mais desfavorecidas as mais afetadas. Os principais grupos afetados são crianças na fase escolar e, em países industrializados, cerca de 60 a 90% desse grupo populacional é atingido assim como a maior parte dos adultos (PETERSEN, 2003; TAUBMAN; NASH, 2006). A cárie dental resulta do processo de descalcificação do tecido rígido do dente, ocasionado pela presença de ácidos gerados por bactérias fermentadoras existentes no biofilme dental. A evolução clínica da doença está relacionada com a associação de vários fatores incluindo hábitos do hospedeiro, dieta rica em carboidratos bem como, a microbiota oral com predominância em espécies cariogênicas, esse conjunto de fatores associados com o tempo, acarreta no estabelecimento e geração da cárie dental (IDONE et al., 2003; TAUBMAN; NASH, 2006; SHIVAKUMAR; VIDYA; CHANDU, 2009; KOO et al., 2010; HUIMIN, 2013).

Vários microrganismos orais estão envolvidos na formação da placa dental, dentre os quais, bactérias do gênero *Streptococcus* são consideradas percussoras no desenvolvimento da doença, sendo a espécie, *Streptococcus mutans* um dos patógenos mais identificados em isolados clínicos de lesões cariosas. *S. mutans* é uma bactéria gram-positiva com formato de coco que tem como habitat natural a cavidade oral humana. Esse patógeno dispõe de características fisiopatológicas únicas, como a eficiência em aderir à superfície dental bem como a capacidade de produzir ácidos e de sobreviver em ambiente ácido, que o torna um dos principais agentes etiológicos da cárie dental em humanos (BANAS, 2004; TAUBMAN; NASH, 2006; KOO et al., 2010; LEMOS et al., 2013).

Uma vez que o *S. mutans* foi isolado e identificado como o principal agente etiológico para o desenvolvimento da cárie dental em humanos (JORDAN; KRASSE; MÖLLER, 1968; LEHNER et al., 1981; CLARK; HIRST; JEPSON, 1998), medidas preventivas incluindo a remoção da placa dental, uso do flúor em água potável e em produtos de higiene, tem sido empregadas para controle do patógeno (BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2000; LEVINE; OWEN; AVERY, 2005). Embora tenha reduzido os números de casos da doença na população, esses tratamentos possuem um custo muito alto e a implementação dessas práticas em populações de baixa

renda os tornam inviáveis. (BANAS, 2004; TAUBMAN; NASH, 2006; SHIVAKUMAR; VIDYA; CHANDU, 2009).

1.2 Antígenos vacinais contra a cárie dental

A concepção de vacinas contra a cárie dental foi estabelecida antes mesmo da descoberta do *S. mutans* como agente primário para o desenvolvimento da placa dentária (CHALLACOMBE; CALDWELL, 1980). A vacinação constitui o método preventivo mais adequado para controle dessa doença. Entretanto, ainda não existe nenhuma vacina licenciada disponível para humanos que atue na prevenção contra essa infecção (HUIMIN, 2013). Em diversos estudos, o principal alvo empregado nas estratégias tem sido o mecanismo primário de adesão utilizado pelo *S. mutans* (BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2000; ZHANG, 2013).

A aderência do *S. mutans* a superfície dental constitui o primeiro passo para o estabelecimento da cárie dental. Esse processo ocorre essencialmente em duas etapas. A primeira etapa consiste na ligação entre a proteína P1 também denominada de antígeno I/II, antígeno B, ou PAc a receptores glicoproteicos, como a glicoproteína 340 (gp340), que se encontram dispostos na película adquirida adsorvida ao dente. Esse, primeiro estágio é independente de sacarose, e considerado reversível. Por outro lado, a segunda etapa, trata-se de um processo complexo e irreversível, o qual necessita de sacarose para a produção de polissacarídeos extracelulares (glucanos), que uma vez formados interagem com as proteínas de superfícies do patógeno, como as proteínas ligadoras de glucanos (Gbps) e as glicosiltransferases (GtfBs) que tem por consequência depósito de massa bacteriana na superfície do dente, gerando o biofilme dental (BANAS, 2004; TAUBMAN; NASH, 2006; BRADY et al., 2010; KOO et al., 2010). Uma das primeiras estratégias vacinais desenvolvidas contra a cárie dental ocorreu na década de 1970 onde vários pesquisadores (TALBMAN; SMITH, 1974; MCGHEE et al., 1975) empregaram como antígeno alvo, o patógeno inteiro (*S. mutans*) por via subcutânea ou glândulas salivares em modelos murinos, com a finalidade de desenvolver uma resposta protetora contra a doença. Os resultados obtidos por esse tipo de imunização foram promissores uma vez que foram capazes de reduzir de forma significativa a colonização oral pelo *S. mutans*. Porém outras pesquisas evidenciaram que essa estratégia poderia induzir anticorpos com reatividade cruzada com fibras cardíacas de humanos e também de coelho (VAN DE RIJN; BLEIWEIS; ZABRISKIE, 1976; HUGHES et al., 1980). Sendo assim,

para a continuação das buscas por novas estratégias o foco principal das vacinas contra a cárie passou a ser restrito a proteínas, fragmentos ou peptídeos originários dos principais fatores de virulências do *S. mutans* envolvidos no mecanismo de patogenicidade, em especial aqueles derivados da proteína P1 que participa da primeira etapa da colonização (BRADY et al., 2010; ZHANG, 2013).

A proteína P1 do *S. mutans* possui 185 kDa e é considerada a maior proteína adesiva existente na superfície deste patógeno. Esse antígeno também se encontra distribuído em todos estreptococos orais como também, foi identificado em outras espécies não orais, como *S. pyogenes* e *S. agalactiae* (MA et al., 1990; BRADY et al., 1992; JENKINSON; DEMUTH, 1997). Ao longo de toda a sequência primária dessa proteína são identificadas seis regiões. A primeira delas corresponde a um peptídeo sinal, em seguida encontra-se uma região rica em alanina, referida como região A. Uma região P rica em prolina, uma sequência transmembrana e um motivo LPXTG para ancoragem da proteína a parede celular, e, além disso, existe também uma poção V denominada região variável que se encontra localizada entre as regiões A e P onde existe maior variabilidade da sequência da proteína P1 entre as espécies de *S. mutans*. A forma terciária dessa proteína possui uma estrutura fibrilar alongada com o tamanho aproximado de 50 nm. Nessa estrutura a região A está disposta em α -hélice entrelaçada com a região P, também uma α -hélice, e na extremidade superior se encontra a região V que se dobra em forma globular (**Figura 1 B**). (BRADY et al., 1992; HAJISHENGALLIS; KOGA; RUSSELL, 1994; SULLAN et al., 2015).

Ao longo de várias décadas, diversos estudos realizados em modelos animais (primatas não humanos e murinos) demonstraram o potencial antigênico da proteína P1 de *S. mutans* em ensaios de imunizações ativa contra a cárie. Em muitos desses estudos, foi verificado que a geração de anticorpos protetores direcionados contra a adesina P1 leva ao bloqueio do processo de adesão e, conseqüentemente, a prevenção do desenvolvimento da cárie dental. O efeito protetor dos anticorpos gerados por esses ensaios foi também evidenciado por meio de imunizações passivas, em primatas não humanos e também em testes clínicos. Nesses estudos verificou-se uma redução da colonização do patógeno na superfície do dente por um longo período. Isso demonstra a relevância da utilização dessa proteína como candidato promissor em estratégias vacinais contra a cárie (LEHNER; CHALLACOMBE; CALDWELL, 1980; LEHNER et al., 1981; TAUBMAN; NASH, 2006; ROBINETTE et al., 2011).

Além do antígeno P1 inteiro, outros pesquisadores resolveram investir em regiões específicas dessa proteína, conhecidos como sítios ou domínios de ligação. Um desses sítios compreende a região A, essa porção é formada por três sequências repetidas de alanina, duas completas e uma incompleta e se encontra localizada na porção amino-terminal da proteína P1 (CROWLEY et al., 1993; HAJISHENGALLIS; KOGA; RUSSELL, 1994; MOISSET et al., 1994; LARSON et al., 2010). Essa porção foi denominada região de ligação à saliva (*Saliva-Binding Region* – SBR) engloba um sítio de ligação a receptores presente na saliva. Esse fragmento é considerado uma das sequências de extrema importância no processo inicial de adesão do patógeno na película salivar aderida ao dente, e conseqüentemente, no desenvolvimento da cárie dental. Desta forma, vários estudos têm investido nessa região como possível candidato em estratégias vacinais contra a cárie dental (NAKAI et al., 1993).

A SRB quando empregada em ensaios de imunização por via de mucosa se mostrou um potente antígeno vacinal com geração de imunidade protetora contra a cárie dental (HAJISHENGALLIS; RUSSELL; MICHALEK, 1998). Mais tarde, Huang e colaboradores (2001), utilizando o mesmo fragmento expresso em *Salmonella* foi capaz de induzir respostas sistêmicas e de mucosa efetivas contra o *S. mutans* (HUANG; HAJISHENGALLIS; MICHALEK, 2001).

Em estudos recentes desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, um fragmento derivado da porção amino terminal da proteína P1 foi caracterizado quanto às suas propriedades imunológicas e indicado como candidato alvo em estratégias vacinais contra a cárie. Esse fragmento abrange toda a região A rica em alanina e uma pequena fração variável (região V) que engloba os aminoácidos de 39-512 e foi denominado como P1₃₉₋₅₁₂ (**Figura 1 A**) (TAVARES et al., 2010). Em outros estudos, o emprego do fragmento P1₃₉₋₅₁₂ ou a SBR, coadministrada a moléculas imunomoduladoras flagelina, alúmen, toxina termolábel (LT), toxina colérica (CT) e derivados de ambos em imunizações por via de mucosa (oral ou nasal), foi capaz de induzir respostas humorais sistêmicas e de mucosa contra cárie (BATISTA et al., 2014; HAJISHENGALLIS et al 1998; LEHNER; RUSSELL; 1978; MICHALEK, 1998).

Figura 1 - Representação esquemática da proteína P1. Sequência primária da proteína P1 de *S. mutans*, demonstrando as seis regiões distintas que compreendem essa proteína. Em destaque, o fragmento P1₃₉₋₅₁₂ (A). Estrutura terciária da proteína P1 contendo seus principais domínios (B).

Fonte: Ambas as figuras foram modificadas dos esquemas desenvolvidos por (ROBINETTE et al., 2011, 2014)

1. 3 Resposta protetora e vias de mucosa.

O conhecimento prévio do tipo de resposta específica contra agentes patogênicos é de extrema importância para o desenvolvimento de uma vacina efetiva. Pois, dependendo do tipo de resposta protetora, a administração de vacinas será eficaz quando essas forem administradas em locais referidos como porta de entrada do patógeno. Sabe-se que o tipo de resposta imune requerida para a proteção contra a cárie dental é principalmente aquela que envolve a produção de IgA secretor (S-IgA). Outro tipo de resposta também associada à proteção contra a cárie é o IgG, proveniente do fluido crevicular gengival. Ambas as respostas (IgA de mucosa e IgG) quando induzidas têm acesso direto à superfície dental e são capazes de interferir no processo de adesão, como por exemplo, o bloqueio da ligação das proteínas adesivas ao dente. Após o conhecimento da resposta protetora e os mecanismos de patogenicidade do *S. mutans* no desenvolvimento da cárie, as vias de entregas de vacinas contra esse patógeno passaram a ser repensadas, dando prioridade às vias de mucosa, como as vias oral, nasal e, mais recentemente a via sublingual (LEHNER; CHALLACOMBE; CALDWELL, 1980; RUSSELL; CHALLACOMBE; LEHNER, 1980; MICHALEK; CHILDERS, 1990; SHIVAKUMAR; VIDYA; CHANDU, 2009; FERREIRA et al., 2016).

A entrega de vacinas por vias de mucosa constitui um meio eficaz para indução de respostas imune protetora contra diferentes doenças infecciosas, cuja patogenicidade

se inicia em regiões da mucosa. Ao contrário das vias parenterais, as vias de mucosa são capazes de estimular respostas específicas locais consideradas importantes para o bloqueio da entrada dos patógenos, como a secreção de IgA, mas também respostas sistêmicas. As estratégias vacinais de mucosa envolvem processos não invasivos, além disso, a entrega de vacinas por essa via oferece várias vantagens ao paciente, como a ausência de dor ou incômodo durante os procedimentos. Essa via também evita os riscos de transmissão de doenças durante os procedimentos de inoculação e não há necessidade de um profissional treinado para aplicação, logo há uma maior aceitabilidade por parte da população (LINTERMANS, P.; DE GREVE, 1995; LAVELLE; O'HAGAN, 2006). Entretanto, vacinas de subunidades empregando fragmentos específicos de um patógeno, como a P1, têm como característica uma reduzida imunogenicidade quando administrada por via de mucosa. Isso ocorre devido à perda de moléculas imunoestimulatórias conhecidas como PAMPs (do inglês "Pathogen-associated molecular pattern molecules") que estão naturalmente presentes na estrutura do patógeno e são importantes para ativação de células do sistema imunológico (LAVELLE; O'HAGAN, 2006). Além disso, esses antígenos quando em ambientes de mucosas podem ser degradados ou mal absorvidos/processados pelas células imunológicas locais.

1.4 Veículos vivos vacinais

Um método alternativo para a entrega de antígenos é a utilização de veículos vacinais vivos empregando microrganismos geneticamente modificados, incluindo vírus, leveduras ou bactérias (RUSSELL; CHALLACOMBE; LEHNER, 1980; LINTERMANS, P.; DE GREVE, 1995; WELLS et al., 1996; LILJEQVIST et al., 1999). A maioria dos vetores utilizados para entrega de antígenos por vias de mucosa exercessem funções como a proteção do antígeno durante o tráfego gastrointestinal ou vias respiratórias, direcionamento do antígeno alvo para locais específicos na mucosa, ou até mesmo atuar como adjuvantes (LINTERMANS, P.; DE GREVE, 1995; APS et al., 2015). Em se tratando do emprego de bactérias recombinantes como vetores de entrega de antígenos, espécies bacterianas referidas como patogênicas atenuadas incluindo *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *M.bovis*, *Micobacterium tuberculosis*, foram bem sucedidas e utilizadas em estratégias vacinais ao longo do tempo (LINTERMANS, P.; DE GREVE, 1995). No entanto, esses modelos de entrega de antígenos podem possibilitar a reversão da atenuação, sendo assim necessário a busca por modelos mais

seguros. A utilização de bactérias não patogênicas como o *Lactobacillus* spp., *Lactococcus lactis*, e o *Bacillus subtilis*, se destaca como um dos modelos que oferecem vantagens de uso em estratégias vacinais (WELLS et al., 1996; ISTICATO et al., 2001; DUC et al., 2003).

B. subtilis é um bacilo gram-positivo, não patogênico e formador de esporos, considerado a forma de vida mais resistentes do planeta. É classificada como uma espécie segura, sendo nomeada com status de GRAS (do inglês “*generally regorded as sarfe*”) pelo FDA americano. Os esporos de *B. subtilis* possuem um histórico relevante em várias áreas de pesquisa, sendo utilizados na indústria para produção de enzimas, bioindicadores em processos de esterilização, além de serem comercializados como probióticos para humanos e animais domesticados. Linhagens de *B. subtilis* são candidatas ao desenvolvimento de estratégias vacinais, seja na produção de antígenos recombinantes ou como veículo vacinal para a entrega de antígenos, que podem ser expressos tanto na forma vegetativa (no meio intracelular) quanto na forma de esporos (fusionado à proteínas nativas da capa do esporo). Na produção de proteínas heterólogas, um dos destaques das linhagens de *B. subtilis* é a ausência da membrana externa, assim, toda proteína secretada pode ser colhida diretamente do meio de crescimento. Outro ponto importante é a ausência de LPS. Logo há uma redução no tempo e também no custo do processo de purificação para obtenção do antígeno alvo. Além disso, com a segurança e a capacidade de esporular, a estocagem, preservação e transportes das vacinas deixam de ser um fator preocupante. Essas características têm despertado o interesse de alguns pesquisadores pela utilização de esporos de *B. subtilis* como candidatos para entrega de antígenos vacinais, principalmente por vias de mucosa (RUSSELL; CHALLACOMBE; LEHNER, 1980; HUANG; HAJISHENGALLIS; MICHALEK, 2001; DUC et al., 2003; FERREIRA; FERREIRA; SCHUMANN, 2005; DE SOUZA et al., 2014)

No início do uso dos esporos de *B. subtilis* como veículo de entrega era possível observar duas estratégias para a expressão dos antígenos alvos. Na primeira delas denominada de modelo “*OUT*”, a proteína de interesse é fusionada às proteínas que revestem a superfície da capa do esporo, principalmente à CotB, CotC, ou CotG (ISTICATO et al., 2001; DUC et al., 2003; MAURIELLO et al., 2004). Na segunda estratégia, a proteína alvo é expressa sob o controle de um promotor (PgsiB), sendo produzida quando a bactéria estiver no estágio vegetativo após a germinação do esporo, estratégia que ficou conhecida como modelo “*IN*” (PACCEZ et al., 2006). Em alguns trabalhos, ambas as estratégias, quando administrados por vias de mucosas, promoveram

uma boa apresentação dos antígenos ao sistema imunológico com a indução de anticorpos específicos sistêmicos ou de mucosa (IgA fecal) (DUC et al., 2003; SCHUMANN, 2007; LUIZ et al., 2008). De forma contraditória, em outros trabalhos, a administração *B. subtilis* na forma de esporos ou células vegetativas por via oral demonstrou uma baixa eficiência na ativação da resposta imunológica contra o antígeno alvo carregado (FERREIRA; FERREIRA; SCHUMANN, 2005). Uma das explicações para esse fenômeno consiste na rápida passagem dos esporos pelo trato oral, e, por consequência, uma reduzida exposição do antígeno carregado ao sistema imune associado ao trato gastrointestinal (GALT) (TAVARES BATISTA et al., 2014)

Além disso, outra possibilidade que merecem ser ressaltada é a ocorrência da tolerância imunológica devido à frequente exposição aos esporos presente no solo e em alimentos. Uma estratégia desenvolvida para solucionar questões como essas, e que vem demonstrando bons resultados, tem sido o emprego de proteínas bacterianas com propriedades adesivas e específicas para receptores de células presentes no tecido de mucosas (CLARK; HIRST; JEPSON, 1998; CRITCHLEY-THORNE; STAGG; VASSAUX, 2006).

Com base nessas evidências, e com o intuito de melhorar a eficiência de entrega de antígenos vacinais por vias de mucosa, nosso grupo de pesquisa descreveu uma nova estratégia baseada em formas recombinantes de esporos de *B. subtilis* empregando as duas abordagens (“OUT” e “IN”) concomitantemente (PACCEZ et al., 2006; BATISTA et al., 2014). Nessa estratégia, os esporos de *B. subtilis* foram manipulados geneticamente para expressar uma proteína adesiva de origem bacteriana (SlpA do *Lactobacillus brevis*) ou a invasina (InvA) de *Yersinia pseudotuberculosis*. Em uma segunda etapa, os esporos de *B. subtilis* foram geneticamente modificados para expressar o fragmento P1₃₉₋₅₁₂ de *S. mutans* após a germinação. Como resultado dessas construções, foi observado que os esporos adesivos de *B. subtilis*, em particular a linhagem expressando a invasina (InvA) denominada de LDV704, persistiram por mais tempo durante a passagem pelo trato gastrointestinal quando administrados por via oral em modelo murino. Além disso, quando esses esporos foram administrados por diferentes vias de mucosa (sublingual e intranasal) foi possível observar um aumento da resposta de anticorpos P1₃₉₋₅₁₂ – específicos (TAVARES BATISTA et al., 2014).

A linhagem LDV704 contém a sequência completa da InvA de *Yersinia pseudotuberculosis*. Essa proteína possibilita a aderência e, em sequência, a internalização da bactéria no meio intracelular, por meio da afinidade de ligação

específica a receptores $\beta 1$ de integrina que estão presentes em superfícies de células M de mucosa (YOUNG; FALKOW; SCHOOLNIK, 1992).

Outra alternativa importante utilizada em estratégias de subunidades é a coadministração dessas formulações a compostos com propriedades imunomoduladoras com capacidade de potencializar ou modular a resposta imunológica contra o antígeno alvo (PULENDRAN; AHMED, 2006). Estes compostos são conhecidos como adjuvante palavra originária do latim “adjuvare” que se refere a “ajudar” (PULENDRAN; AHMED, 2006). A toxina LT (enterotoxina termo-lábil), produzida por algumas linhagens de *Escherichia coli* enterotoxigênica, representa um dos adjuvantes mais potentes coadministrados a antígenos vacinais por vias de mucosa. No entanto, por se tratar de uma molécula tóxica, sua utilização em formulações vacinais voltadas para humanos, torna-se inviável. Desta forma, diferentes mutantes de LT em condições laboratoriais foram produzidos com a finalidade de diminuir o efeito tóxico, porém, mantendo o efeito adjuvante. O mutante LTK63 é um exemplo que apresenta características estruturais da toxina parental, mas sua atividade enzimática é completamente abolida, tornando-a atóxica. Estudos anteriores demonstraram que o variante atóxico LTK63 é um forte candidato a adjuvante de mucosas, capaz de estimular resposta protetora humoral e celular (PALMA et al., 2008; ERUME; PARTIDOS, 2011).

Embora, as imunizações com os esporos recombinantes, ou a presença de adjuvantes em doses homólogas por vias de mucosa, tenha demonstrado eficiência na ativação de respostas sistêmicas efetivas, essas abordagens ainda se mostram ineficazes na ativação e manutenção de anticorpos protetores, como é o caso do IgA secretória nos sítios de mucosa. Esses episódios consistem nos principais obstáculos evidenciados nas pesquisas para aquisição de uma vacina eficaz contra a cárie dental. Para reverter essas situações, novas abordagens de administrações são necessárias. A estratégia de imunização sensibilização e reforço (prime-boost) heterólogo, descrita inicialmente em 1993, baseia-se na estimulação do sistema imune mediante a administração do antígeno alvo por duas formas distintas, onde na primeira dose “prime” o sistema imune é estimulado por ação do antígeno associado a um vetor e, na segunda dose, o “boost” emprega o antígeno no contexto de uma formulação distinta. Na maioria das vezes essa estratégia demonstra ser bem mais eficiente para ativação do sistema imune em relação aos regimes homólogos tradicionalmente utilizados em vacinas sensibilização e reforço (LI et al., 1993; LU, 2009).

A estratégia dose-reforço heteróloga, permite a combinação de diversas formas de apresentação do antígeno em um mesmo regime vacinal, (HU et al., 1992; LASARO et al., 2005; DE ALENCAR et al., 2009; RIGATO et al., 2011) Em trabalho realizado por Ciabattini e colaboradores (2004), um regime vacinal do tipo “prime-boost” heterólogo, cujo “prime” foi realizado com esporos de *B. subtilis* como veículo vacinal vivo, capaz de expressar o fragmento C da toxina tetânica por via de mucosa oral, e o “boost” consistia na administração do mesmo antígeno em sua forma purificada, por via parenteral (subcutânea) resultou em respostas imunológicas antígenos-específicas locais e sistêmicas compatíveis com o correlato de proteção previsto para esta toxina. Apesar de promissor, o regime “prime-boost” heterólogo ainda não foi explorado com antígenos recombinante da proteína P1 de *S. mutans*, e poderia ser uma boa alternativa para entrega dos antígenos por vias de mucosa em estratégias vacinais contra a cárie.

Com base no exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar uma nova estratégia vacinal de mucosa do tipo “prime-boost” heterólogo contra o *S. mutans*. Nessa estratégia utilizamos como antígeno alvo a proteína recombinante P1₃₉₋₅₁₂, sendo ela administrada na forma de esporos de *B. subtilis* e na forma de proteína purificada na presença ou ausência do adjuvante LTK63 por via sublingual.

6 CONCLUSÕES

- Todas as formulações empregadas em esquemas de sensibilização e reforço heterólogo mostraram-se capazes de ativar resposta de IgG anti-P1₃₉₋₅₁₂.
- Os grupos imunizados com as formulações na presença do adjuvante LTK63 induziram resultados significativos nas respostas de anticorpos sistêmicos.
- O regime vacinal de sensibilização e reforço heterólogo não induziu resposta IgA específica em mucosas nas condições testadas.
- A coadministração do antígeno com o adjuvante LTK63 potencializou as respostas imunes sistêmicas, e também aumentou a quantidade de anticorpos gerados e com capacidade de reconhecer o antígeno recombinante presente na proteína expressa na superfície da bactéria.
- Os esporos de *B. subtilis*, utilizados como veículos vivos para a apresentação do antígeno, representam uma plataforma promissora na entrega de antígenos vacinais, uma vez que possuem a capacidade de preservar o antígeno transportado, mostram-se seguros para a administração em seres humanos e possuem baixo custo de produção.

REFERÊNCIAS*

AMUGUNI, H.; LEE, S.; KERSTEIN, K.; BROWN, D.; BELITSKY, B.; HERRMANN, J.; KEUSCH, G.; SONENSHEIN, A.; TZIPORI, S. Sublingual immunization with an engineered *Bacillus subtilis* strain expressing tetanus toxin fragment C induces systemic and mucosal immune responses in piglets. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 5, p. 447–456, maio 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22198093>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

AMUGUNI, J. H.; LEE, S.; KERSTEIN, K. O.; BROWN, D. W.; BELITSKY, B. R.; HERRMANN, J. E.; KEUSCH, G. T.; SONENSHEIN, A. L.; TZIPORI, S. Sublingually administered *Bacillus subtilis* cells expressing tetanus toxin C fragment induce protective systemic and mucosal antibodies against tetanus toxin in mice. **Vaccine**, v. 29, n. 29–30, p. 4778–4784, 24 jun. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21565244>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

APS, L. R. M. M.; DINIZ, M. O.; PORCHIA, B. F. M. M.; SALES, N. S.; MORENO, A. C. R.; FERREIRA, L. C. S. *Bacillus subtilis* spores as adjuvants for DNA vaccines. **Vaccine**, v. 33, n. 20, p. 2328–2334, 11 maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25819710>>. Acesso em: 25 nov. 2017.

BALAKRISHNAN, M.; SIMMONDS, R. S.; TAGG, J. R. Dental caries is a preventable infectious disease. **Australian dental journal**, v. 45, n. 4, p. 235–45, dez. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11225524>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

BANAS, J. A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 9, p. 1267–77, 1 maio 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14977543>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

BARNES, A. G. C.; CEROVIC, V.; HOBSON, P. S.; KLAVINSKIS, L. S. *Bacillus subtilis* spores: A novel microparticle adjuvant which can instruct balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 6, p. 1538–1547, 2007.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

BATISTA, M. T.; SOUZA, R. D.; FERREIRA, E. L.; ROBINETTE, R.; CROWLEY, P. J.; RODRIGUES, J. F.; BRADY, L. J.; FERREIRA, L. C. S.; FERREIRA, R. C. C. Immunogenicity and in vitro and in vivo protective effects of antibodies targeting a recombinant form of the *Streptococcus mutans* P1 surface protein. **Infection and immunity**, v. 82, n. 12, p. 4978–88, dez. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25225243>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

BRADY, L. J.; MADDOCKS, S. E.; LARSON, M. R.; FORSGREN, N.; PERSSON, K.; DEIVANAYAGAM, C. C.; JENKINSON, H. F. The changing faces of *Streptococcus* antigen I/II polypeptide family adhesins. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 276–286, 24 maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20497507>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

BRADY, L. J.; PIACENTINI, D. A.; CROWLEY, P. J.; OYSTON, P. C.; BLEIWEIS, A. S. Differentiation of salivary agglutinin-mediated adherence and aggregation of *mutans streptococci* by use of monoclonal antibodies against the major surface adhesin P1. **Infection and immunity**, v. 60, n. 3, p. 1008–17, mar. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1541515>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

CIABATTINI, A.; PARIGI, R.; ISTICATO, R.; OGGIONI, M. R.; POZZI, G. Oral priming of mice by recombinant spores of *Bacillus subtilis*. **Vaccine**, v. 22, n. 31–32, p. 4139–4143, 2004.

CLARK, M. A.; HIRST, B. H.; JEPSON, M. A. M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. **Infection and immunity**, v. 66, n. 3, p. 1237–43, mar. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9488419>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

CRITCHLEY-THORNE, R. J.; STAGG, A. J.; VASSAUX, G. Recombinant *Escherichia coli* Expressing Invasin Targets the Peyer's Patches: the Basis for a Bacterial Formulation for Oral Vaccination. **Molecular Therapy**, v. 14, n. 2, p. 183–191, ago. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16581299>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

CROWLEY, P. J.; BRADY, L. J.; PIACENTINI, D. A.; BLEIWEIS, A. S. **Identification of a salivary agglutinin-binding domain within cell surface adhesin P1 of *Streptococcus mutans*** *Infection and Immunity*, 1993. .

ÇUBURU, N.; KWEON, M.-N.; SONG, J.-H.; HERVOUET, C.; LUCI, C.; SUN, J.-B.; HOFMAN, P.; HOLMGREN, J.; ANJUÈRE, F.; CZERKINSKY, C. Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. **Vaccine**, v. 25, n. 51, p. 8598–8610, 12 dez. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17996991>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

DALMIA, N.; RAMSAY, A. J. Prime-boost approaches to tuberculosis vaccine development. **Expert review of vaccines**, v. 11, n. 10, p. 1221–33, 2012.

DE ALENCAR, B. C. G.; PERSECHINI, P. M.; HAOLLA, F. A.; DE OLIVEIRA, G.; SILVERIO, J. C.; LANNES-VIEIRA, J.; MACHADO, A. V.; GAZZINELLI, R. T.; BRUNA-ROMERO, O.; RODRIGUES, M. M. Perforin and gamma interferon expression are required for CD4⁺ and CD8⁺ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4383–4395, 2009.

DE SOUZA, R. D.; BATISTA, M. T.; LUIZ, W. B.; CAVALCANTE, R. C. M.; AMORIM, J. H.; BIZERRA, R. S. P.; MARTINS, E. G.; DE SOUZA FERREIRA, L. C. *Bacillus subtilis* spores as vaccine adjuvants: Further insights into the mechanisms of action. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

DORNER, M.; ZUCOL, F.; ALESSI, D.; HAERLE, S. K.; BOSSART, W.; WEBER, M.; BYLAND, R.; BERNASCONI, M.; BERGER, C.; TUGIZOV, S.; SPECK, R. F.; NADAL, D. Beta1 integrin expression increases susceptibility of memory B cells to Epstein-Barr virus infection. **Journal of virology**, v. 84, n. 13, p. 6667–77, 2010.

DUC, L. H.; HONG, H. A.; FAIRWEATHER, N.; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Bacterial spores as vaccine vehicles. **Infection and immunity**, v. 71, n. 5, p. 2810–8, maio 2003a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12704155>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

DUC, L. H.; HONG, H. A.; FAIRWEATHER, N.; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Bacterial spores as vaccine vehicles. **Infection and immunity**, v. 71, n. 5, p. 2810–8, maio 2003b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12704155>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

ERUME, J.; PARTIDOS, C. Evaluation of the LTK63 adjuvant effect on cellular immune responses to measles virus nucleoprotein. **African health sciences**, v. 11, n. 2, p. 151–157, 2011.

FERREIRA, E. L.; BATISTA, M. T.; CAVALCANTE, R. C. M.; PEGOS, V. R.; PASSOS, H. M.; SILVA, D. A.; BALAN, A.; FERREIRA, L. C. S.; FERREIRA, R. C. C. Sublingual immunization with the phosphate-binding-protein (PstS) reduces oral colonization by *Streptococcus mutans*. **Molecular Oral Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 410–422, 2016.

FERREIRA, L. C. S.; FERREIRA, R. C. C.; SCHUMANN, W. *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: From antigen factories to delivery vectors. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 77, n. 1, p. 113–124, 2005.

FOERSTER, H. F.; FOSTER, J. W. Endotrophic calcium, strontium, and barium spores of *Bacillus megaterium* and *Bacillus cereus*. **Journal of Bacteriology**, v. 91, n. 3, p. 1333–1345, 1966.

HAJISHENGALLIS, G.; KOGA, T.; RUSSELL, M. W. Affinity and Specificity of the Interactions between *Streptococcus mutans* Antigen I/II and Salivary Components. **Journal of Dental Research**, v. 73, n. 9, p. 1493–1502, 8 set. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7523469>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

HAJISHENGALLIS, G.; RUSSELL, M. W.; MICHALEK, S. M. Comparison of an adherence domain and a structural region of *Streptococcus mutans* antigen I/II in protective immunity against dental caries in rats after intranasal immunization. **Infection and immunity**, v. 66, n. 4, p. 1740–3, abr. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529105>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

HU, S. L.; ABRAMS, K.; BARBER, G. N.; MORAN, P.; ZARLING, J. M.; LANGLOIS, A. J.; KULLER, L.; MORTON, W. R.; BENVENISTE, R. E. Protection of macaques against SIV infection by subunit vaccines of SIV envelope glycoprotein gp160. **Science (New York, N.Y.)**, v. 255, n. 5043, p. 456–9, 24 jan. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1531159>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

HUANG, Y.; HAJISHENGALLIS, G.; MICHALEK, S. M. Induction of Protective Immunity against *Streptococcus mutans* Colonization after Mucosal

Immunization with Attenuated *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Expressing an *S. mutans* Adhesin under the Control of In Vivo-Inducible *nirB* Promoter. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 4, p. 2154–2161, 1 abr. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11254570>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

HUGHES, M.; MACHARDY, S. M.; SHEPPARD, A. J.; WOODS, N. C. Evidence for an immunological relationship between *Streptococcus mutans* and human cardiac tissue. **Infection and immunity**, v. 27, n. 2, p. 576–88, fev. 1980a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6991419>>. Acesso em: 25 nov. 2017.

HUGHES, M.; MACHARDY, S. M.; SHEPPARD, A. J.; WOODS², N. C. Evidence for an Immunological Relationship Between *Streptococcus mutans* and Human Cardiac Tissue. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 27, n. 2, p. 576–588, 1980b. Disponível em: <<http://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC550804&blobtype=pdf>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

HUIMIN, Y. SCIENCE CHINA SPECIAL TOPIC: Impaired immune response and immunologic adjuvants Salivary IgA enhancement strategy for development of a nasal-spray anti-caries mucosal vaccine. v. 56, n. 5, p. 406–413, 2013. Disponível em: <www.springer.com/scp>. Acesso em: 19 nov. 2017.

IDONE, V.; BRENDTRO, S.; GILLESPIE, R.; KOCAJ, S.; PETERSON, E.; RENDI, M.; WARREN, W.; MICHALEK, S.; KRASTEL, K.; CVITKOVITCH, D.; SPATAFORA, G. Effect of an orphan response regulator on *Streptococcus mutans* sucrose-dependent adherence and cariogenesis. **Infection and immunity**, v. 71, n. 8, p. 4351–60, 1 ago. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12874312>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

ISTICATO, R.; CANGIANO, G.; TRAN, H. T.; CIABATTINI, A.; MEDAGLINI, D.; OGGIONI, M. R.; DE FELICE, M.; POZZI, G.; RICCA, E. Surface Display of Recombinant Proteins on *Bacillus subtilis* Spores. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 21, p. 6294–6301, 1 nov. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11591673>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

JENKINSON, H. F.; DEMUTH, D. R. Structure, function and immunogenicity of streptococcal antigen I/II polypeptides. **Molecular microbiology**, v. 23, n. 2, p. 183–90, jan. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9044252>>. Acesso em:

19 nov. 2017.

JORDAN, H. V.; KRASSE, B.; MÖLLER, A. A method of sampling human dental plaque for certain “caries-inducing” streptococci. **Archives of Oral Biology**, v. 13, n. 8, p. 919–927, 1968.

KOO, H.; XIAO, J.; KLEIN, M. I.; JEON, J. G. Exopolysaccharides Produced by *Streptococcus mutans* Glucosyltransferases Modulate the Establishment of Microcolonies within Multispecies Biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 12, p. 3024–3032, 15 jun. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20233920>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

LARSON, M. R.; RAJASHANKAR, K. R.; PATEL, M. H.; ROBINETTE, R. A.; CROWLEY, P. J.; MICHALEK, S.; BRADY, L. J.; DEIVANAYAGAM, C. Elongated fibrillar structure of a streptococcal adhesin assembled by the high-affinity association of - and PPII-helices. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 13, p. 5983–5988, 2010. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0912293107>>.

LASARO, M. O.; LUIZ, W. B.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; FERREIRA, L. C. S. Prime-boost vaccine regimen confers protective immunity to human-derived enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Vaccine**, v. 23, n. 19, p. 2428–2436, 2005.

LAVELLE, E. C.; O’HAGAN, D. T. Delivery systems and adjuvants for oral vaccines. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 3, n. 6, p. 747–762, nov. 2006. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425247.3.6.747>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

LEHNER, T.; CHALLACOMBE, S. J.; CALDWELL, J. Oral immunization with *Streptococcus mutans* in rhesus monkeys and the development of immune response and dental caries. **Immunology**, v. 41, n. 4, p. 857–64, dez. 1980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7461713>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

LEHNER, T.; RUSSELL, M. W.; CALDWELL, J.; SMITH, R. Immunization with purified protein antigens from *Streptococcus mutans* against dental caries in rhesus monkeys. **Infection and immunity**, v. 34, n. 2, p. 407–15, nov. 1981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7309233>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

LEMOS, J. A.; QUIVEY, R. G.; KOO, H.; ABRANCHES, J.; ABRANCHES, J. Streptococcus mutans: a new Gram-positive paradigm? **Microbiology (Reading, England)**, v. 159, n. Pt 3, p. 436–45, mar. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23393147>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

LEVINE, M.; OWEN, W. L.; AVERY, K. T. Antibody response to actinomyces antigen and dental caries experience: implications for caries susceptibility. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 12, n. 6, p. 764–9, jun. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15939752>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

LI, S.; RODRIGUES, M.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J. R.; ESTEBAN, M.; PALESE, P.; NUSSENZWEIG, R. S.; ZAVALA, F. Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. June, p. 5214–5218, 1993.

LILJEQVIST, S.; CANO, F.; NGUYEN, T. N.; UHLÉN, M.; ROBERT, A.; STÅHL, S. Surface display of functional fibronectin-binding domains on Staphylococcus carnosus. **FEBS letters**, v. 446, n. 2–3, p. 299–304, 12 mar. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10100862>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

LINTERMANS, P.; DE GREVE, H. Live bacterial vectors for mucosal immunization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 18, n. 1, p. 73–89, 15 dez. 1995. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0169409X95000518>>. Acesso em: 25 nov. 2017.

LU, S. Heterologous prime–boost vaccination. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 3, p. 346–351, jun. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19500964>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

LUIZ, W. B.; CAVALCANTE, R. C. M.; PACCEZ, J.; SOUZA, R. D.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; FERREIRA, R. C. C.; FERREIRA, L. C. S. Boosting systemic and secreted antibody responses in mice orally immunized with recombinant Bacillus subtilis strains following parenteral priming with a DNA vaccine encoding the enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) CFA/I fimbriae B subunit. **Vaccine**, v. 26, n. 32, p. 3998–4005, 2008.

MA, J. K.; HUNJAN, M.; SMITH, R.; KELLY, C.; LEHNER, T. An investigation into the mechanism of protection by local passive immunization with monoclonal antibodies against *Streptococcus mutans*. **Infection and immunity**, v. 58, n. 10, p. 3407–14, out. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2401569>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

MAURIELLO, E. M. F.; DUC, L. H.; ISTICATO, R.; CANGIANO, G.; HONG, H. A.; DE FELICE, M.; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner. **Vaccine**, v. 22, n. 9–10, p. 1177–1187, 2004.

MCGHEE; MICHALEK, S. M.; WEBB, J.; NAVIA, J. M.; RAHMAN, A. F.; LEGLER, D. W. Effective immunity to dental caries: protection of gnotobiotic rats by local immunization with *Streptococcus mutans*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 114, n. 1 Pt 2, p. 300–5, jan. 1975. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/804000>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

MICHALEK, S. M.; CHILDERS, N. K. Development and Outlook for a Caries Vaccine Oral Biology and Medicine Development and Outlook for a Caries Vaccine. 1990. Disponível em: <<http://cro.sagepub.com/>>. Acesso em: 25 nov. 2017.

MOISSET, A.; SCHATZ, N.; LEPOIVRE, Y.; AMADIO, S.; WACHSMANN, D.; SCHÖLLER, M.; KLEIN, J. P. Conservation of salivary glycoprotein-interacting and human immunoglobulin G-cross-reactive domains of antigen I/II in oral streptococci. **Infection and immunity**, v. 62, n. 1, p. 184–93, jan. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8262626>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

NAKAI, M.; OKAHASHI, N.; OHTA, H.; KOGA, T. Saliva-binding region of *Streptococcus mutans* surface protein antigen. **Infection and immunity**, v. 61, n. 10, p. 4344–9, out. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8406823>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

NASCIMENTO, I. P.; LEITE, L. C. C. **Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2012. .

PACCEZ, J. D.; LUIZ, W. B.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; FERREIRA, R. C. C.; SCHUMANN, W.; FERREIRA, L. C. S. Stable episomal expression system under

control of a stress inducible promoter enhances the immunogenicity of *Bacillus subtilis* as a vector for antigen delivery. **Vaccine**, v. 24, n. 15, p. 2935–2943, 5 abr. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16503367>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

PALMA, C.; IONA, E.; GIANNONI, F.; PARDINI, M.; BRUNORI, L.; FATTORINI, L.; DEL GIUDICE, G.; CASSONE, A. The LTK63 adjuvant improves protection conferred by Ag85B DNA-protein prime-boosting vaccination against *Mycobacterium tuberculosis* infection by dampening IFN- γ response. **Vaccine**, v. 26, n. 33, p. 4237–4243, 2008.

PETERSEN, P. E. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. **Community dentistry and oral epidemiology**, v. 31 Suppl 1, p. 3–23, dez. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15015736>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

PULENDRAN, B.; AHMED, R. Translating innate immunity into immunological memory: Implications for vaccine development. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 849–863, 2006.

REDFORD, P. S.; MURRAY, P. J.; O’GARRA, A. The role of IL-10 in immune regulation during *M. tuberculosis* infection. **Mucosal Immunology**, v. 4, n. 3, p. 261–270, 2011.

RIGATO, P. O.; DE ALENCAR, B. C.; DE VASCONCELOS, J. R. C.; DOMINGUEZ, M. R.; ARAÚJO, A. F.; MACHADO, A. V.; GAZZINELLI, R. T.; BRUNA-ROMERO, O.; RODRIGUES, M. M. Heterologous plasmid DNA prime-recombinant human adenovirus 5 boost vaccination generates a stable pool of protective long-lived CD8⁺ T effector memory cells specific for a human parasite, *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 5, p. 2120–2130, 2011.

ROBINETTE, R. A.; HEIM, K. P.; OLI, M. W.; CROWLEY, P. J.; MCARTHUR, W.P.; BRADY, L. J. Alterations in immunodominance of *Streptococcus mutans* AgI/II: lessons learned from immunomodulatory antibodies. **Vaccine**, v. 32, n. 3, p. 375–82, 9 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24252705>>. Acesso em: 16 dez. 2017.

ROBINETTE, R. A.; OLI, M. W.; MCARTHUR, W. P.; BRADY, L. J. A therapeutic anti-Streptococcus mutans monoclonal antibody used in human passive protection trials influences the adaptive immune response. **Vaccine**, v. 29, n. 37, p. 6292–300, 26 ago. 2011b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21704107>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

RODRIGUES, J. F.; MATHIAS-SANTOS, C.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; AMORIM, J. H.; CABRERA-CRESPO, J.; BALAN, A.; FERREIRA, L. C. S. Functional diversity of heat-labile toxins (LT) produced by enterotoxigenic Escherichia coli: Differential enzymatic and immunological activities of LT1 (hLT) and LT4 (pLT). **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 7, p. 5222–5233, 2011a.

RUSSELL, M. W.; CHALLACOMBE, S. J.; LEHNER, T. Specificity of antibodies induced by Streptococcus mutans during immunization against dental caries. **Immunology**, v. 40, n. 1, p. 97–106, 1980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbinpost/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0007419244>>.

RUSSELL, M. W.; LEHNER, T. Characterisation of antigens extracted from cells and culture fluids of Streptococcus mutans serotype c. **Archives of Oral Biology**, v. 23, n. 1, p. 7–15, 1978.

RYAN, E. J.; MCNEELA, E.; PIZZA, M.; RAPPUOLI, R.; O'NEILL, L.; MILLS, K. H. Modulation of innate and acquired immune responses by Escherichia coli heat-labile toxin: distinct pro- and anti-inflammatory effects of the nontoxic AB complex and the enzyme activity. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 165, n. 10, p. 5750–9, 15 nov. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11067933>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

SCHUMANN, W. **Production of Recombinant Proteins in Bacillus subtilis** *Advances in Applied Microbiology*, 2007.

SHIVAKUMAR, K. M.; VIDYA, S. K.; CHANDU, G. N. Dental caries vaccine. **Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research**, v. 20, n. 1, p. 99–106, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19336869>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

STASIŁOJC, M.; HINC, K.; PESZYŃSKA-SULARZ, G.; OBUCHOWSKI, M.; IWANICKI, A. Recombinant *Bacillus subtilis* Spores Elicit Th1/Th17-Polarized Immune Response in a Murine Model of *Helicobacter pylori* Vaccination. **Molecular biotechnology**, v. 57, n. 8, p. 685–91, ago. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25779639>>. Acesso em: 17 dez. 2017.

SULLAN, R. M. A.; LI, J. K.; CROWLEY, P. J.; BRADY, L. J.; DUFRÊNE, Y. F. Binding Forces of *Streptococcus mutans* P1 Adhesin. **ACS Nano**, v. 9, n. 2, p. 1448–1460, 24 fev. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25671413>>. Acesso em: 25 nov. 2017.

TALBMAN, M. A.; SMITH, D. J. Effects of local immunization with *Streptococcus mutans* on induction of salivary immunoglobulin A antibody and experimental dental caries in rats. **Infection and immunity**, v. 9, n. 6, p. 1079–91, jun. 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4545425>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

TAUBMAN, M. A.; NASH, D. A. The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 7, p. 555–563, 26 jul. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16729013>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

TAVARES, M. B.; SILVA, B. M.; CAVALCANTE, R. C. M.; SOUZA, R. D.; LUIZ, W. B.; PACCEZ, J. D.; CROWLEY, P. J.; BRADY, L. J.; FERREIRA, L. C. S.; FERREIRA, R. C. C. Induction of neutralizing antibodies in mice immunized with an amino-terminal polypeptide of *Streptococcus mutans* P1 protein produced by a recombinant *Bacillus subtilis* strain. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 59, n. 2, p. 131–42, 1 jul. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20402772>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

TAVARES, M. B.; SOUZA, R. D.; LUIZ, W. B.; CAVALCANTE, R. C. M.; CASAROLI, C.; MARTINS, E. G.; FERREIRA, R. C. C.; FERREIRA, L. C. S. *Bacillus subtilis* Endospores at High Purity and Recovery Yields: Optimization of Growth Conditions and Purification Method. **Current Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 279–285, 27 mar. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00284-012-0269-2>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

TAVARES BATISTA, M.; SOUZA, R. D.; PACCEZ, J. D.; LUIZ, W. B.; FERREIRA,

E. L.; CAVALCANTE, R. C. M.; FERREIRA, R. C. C.; FERREIRA, L. C. S. Gut Adhesive Bacillus subtilis Spores as a Platform for Mucosal Delivery of Antigens. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 4, p. 1414–1423, 1 abr. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24421038>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

VAN DE RIJN, I.; BLEIWEIS, A. S.; ZABRISKIE, J. B. Antigens in Streptococcus mutans cross reactive with human heart muscle. **Journal of dental research**, v. 55 Spec No, p. C59-64, abr. 1976. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/770525>>. Acesso em: 25 nov. 2017.

WELLS, J. M.; ROBINSON, K.; CHAMBERLAIN, L. M.; SCHOFIELD, K. M.; LE PAGE, R. W. Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 70, n. 2–4, p. 317–30, out. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8879413>>. Acesso em: 25 nov. 2017.

WILLIAMS, A. E.; EDWARDS, L.; HUMPHREYS, I. R.; SNELGROVE, R.; RAE, A.; RAPPUOLI, R.; HUSSELL, T. Innate imprinting by the modified heat-labile toxin of Escherichia coli (LTK63) provides generic protection against lung infectious disease. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, p. 7435–7443, 2004.

WORSLEY, D. J.; MARSHMAN, Z.; ROBINSON, P. G.; JONES, K. Prevention of dental caries through the use of fluoride – the WHO approach. **Community dental health**, v. 33, n. 1, p. 9–14, 2016.

YOUNG, V. B.; FALKOW, S.; SCHOOLNIK, G. K. The invasin protein of Yersinia enterocolitica: internalization of invasin-bearing bacteria by eukaryotic cells is associated with reorganization of the cytoskeleton. **The Journal of cell biology**, v. 116, n.1, p.197207, jan.1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1730744>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

ZHANG, S. Dental caries and vaccination strategy against the major cariogenic pathogen, Streptococcus mutans. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 14, n. 11, p. 960–6, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24372246>>. Acesso em: 19 nov. 2017.